

551,378

BEST AVAILABLE COPY

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087897 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003848

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 22 日 (22.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-096002 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 政代 (TAKAHASHI, Masayo). 笹井 芳樹 (SASAI, Yoshiki). 河崎 洋志 (KAWASAKI, Hiroshi). 大音 壮太郎 (OOTO, Sotaro).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRODUCING LENS CELL AND LENS CELL OBTAINED BY THE METHOD

(54) 発明の名称: 水晶体細胞の作製方法、およびこの方法によって得られる水晶体細胞

(57) Abstract: A method of producing a lens cell comprising the ES cell-maintaining step wherein ES cells are maintained by using a medium containing fibroblast growth factor FGF-2 at a concentration of from 2 to 50 ng/ml, and the differentiation-inducing step following the ES cell-maintaining step wherein the ES cells are transplanted and cultured in mouse skull bone marrow cells PA6 at a cell density of from 2 to 6.5 colonies/cm² to thereby induce the differentiation of the ES cells into lens cells. It is preferred to further employ the step of washing the undifferentiated ES cells once with the use of an ES differentiation medium between the above-described ES cell-maintaining step and the above-described differentiation-inducing step.(57) 要約: 本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を 2~50 ng/ml の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨髄細胞 PA6 上に 2~6.5 コロニー/cm² の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなるものである。また、上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、ES 分化培地を用いて未分化の ES 細胞を 1 回のみ洗浄する工程をさらに含むことが好ましい。

WO 2004/087897 A1

明 細 書

水晶体細胞の作製方法、およびこの方法によって得られる水晶体細胞

技術分野

5 本発明は、白内障などの眼疾患の治療に応用でき、胚性幹細胞（E
S）細胞から水晶体細胞への分化を誘導することで水晶体細胞を作製す
る新規の方法、および、この作製方法によって得られる水晶体細胞に関
するものである。

背景技術

10 白内障は、種々の原因で水晶体に混濁を生ずる疾患であり、水晶体の
混濁によって視力低下を引き起こす重大な眼疾患である。現在の白内障
の治療法としては、混濁した水晶体を水晶体嚢内から切除し、後嚢上に
人工の眼内レンズを固定するという手術によるものが一般的である。こ
15 の治療法に用いられる眼内レンズは、眼球の切開を小さくするためによ
りソフトなものへと改良が進められている。

しかしながら、この人工の眼内レンズでは、レンズ厚の調節は行えず
本来生体の水晶体が有するような調節力を再現することができないのが
現状である。そのため、眼内レンズを移植するという白内障手術では、
水晶体の弾力性が低下して近くを見るとき焦点を合わせる調節機能が
20 低下した状態である、所謂老眼（老視）状態を改善することはできない。
また、若年者の白内障では、手術により一挙に老視化するために手術に
踏み切れない例も多く存在する。

そこで、近年注目されている組織培養技術を利用してヒトの水晶体細胞を培養し、移植用の生体材料として使用すれば、上述の問題点が解決できると考えられるため、昨今盛んに研究が行われている。その一例として、特許文献 1（米国特許第 5,643,782 号明細書）には、ヒト水晶体上皮細胞にハイブリッドアデノウィルス SV40 を感染させることによって、また、特許文献 2（米国特許第 5,885,832 号明細書）にはヒト水晶体上皮細胞に不死化遺伝子（SV40 のラージ T 抗原をコードする遺伝子）を導入することによって、不死化したヒト水晶体上皮細胞を作製する方法が記載されている。

しかしながら、この特許文献 1 および 2 のように、細胞を不死化するということは、細胞が常に腫瘍化するという危険性もはらんでいる。また、アデノウィルス感染では、炎症を引き起こすという危険性も有している。

以上のように、生体材料として水晶体細胞を培養する技術に関する研究は盛んに行われているものの、今のところ、実際に生体材料として使用できるヒト水晶体細胞を作り出す方法は確立されていないのが現状である。

ところで、最近、霊長類やヒトにおいて胚性幹細胞（ES 細胞）が単離され、これからの医療として再生医学が注目されている（特許文献 3：米国特許第 5,843,780 号明細書、特許文献 4：米国特許第 6,200,806 号明細書参照）。この再生医学を利用することによって、ES 細胞から水晶体細胞への誘導方法が確立できれば、水晶体細胞を嚢内へ注入することによって、調節力を持ったレンズを再生できる可能性があり、白内障と同時に老眼の治療も可能となる。また、このような ES

細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献 1 および 2 のような細胞操作を行うものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。

5 非特許文献 1 (Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. et. al., Induction of midbrain dopaminergic from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, Neuron, 2000 年、28 巻、31-40 頁)、非特許文献 2 (Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. et. al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity, 10 Proc Natl Acad Sci USA, 2002 年、99 巻、1580-1585 頁) には、ES 細胞への分化誘導法として SDIA 法を用いて、神経細胞や網膜色素上皮細胞を産生することができると報告されている。しかしながら、上記文献に記載の方法では、均質な細胞群を再生することはできない。

15 このように、これまでのところ、実用に供する目的で、霊長類での水晶体の再生に成功した例はなく、その生産方法の確立が待たれている。そこで本発明は、ES 細胞に分化を誘導することで水晶体細胞を安定して作製する方法、および、この方法によって作製される水晶体細胞を提供する。

20 発明の開示

本願発明者等は、上記の問題点について鋭意検討した結果、上記非特許文献 1、2 に記載の SDIA (Stromal-cell-Derived Inducing Activity) 法を応用し、その ES 細胞維持条件や分化誘導条件を様々に変更することによって、水晶体細胞を安定して生産できることを見出し、

本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を $2 \sim 50 \text{ ng/ml}$ の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨細胞 PA6 上に $2 \sim 6.5 \text{ コロニー/cm}^2$ の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とするものである。

上記の方法によれば、ES 細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。なお、この水晶体細胞およびその組織は、本明細書ではレントイドとも呼ぶ。上記の方法で作製された水晶体細胞およびその組織（レントイド）を移植用の生体材料として用いれば、従来の白内障の治療などに用いられる人工の眼内レンズとは異なって、本来の生体が有する水晶体厚の調節力と同様の調節力を有することができる。

さらに、上記の方法によって作製される ES 細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献 1 および 2 のような細胞操作を行って得られるものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。また、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、ES 細胞を利用した分化誘導に関する種々のメカニズムの解明に繋がるとともに、再生医療の発展に貢献することが期待され、非常に有用である。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法は、上述の工程に加えて、上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記 ES 細胞

胞を、ES分化培地を用いて1回洗浄する洗浄工程をさらに含むことが好ましい。

上記の方法によれば、ES細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。それゆえ、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、生体材料としての利用可能性を有し、再生医療の発展に貢献することができる。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法において、上記ES細胞は霊長類由来のものであることが好ましい。

上記の方法によれば、ヒトも霊長類に属するため、よりヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することができる。そのため、上記の方法によって作製された水晶体細胞は、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。なお、本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む霊長類のES細胞から水晶体細胞への分化誘導を成功させた初めての方法である。

なお、上記霊長類として具体的には、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、カニクイザルなどが挙げられる。後述の実施例においては、カニクイザルのES細胞について、本発明の方法を用いて水晶体細胞が実際に分化誘導されており、霊長類の生体における水晶体の分化過程と同じような分化過程をたどることが確認されている。そのため、本発明の水晶体方法の作製方法は、カニクイザル由来のものであることがより好ましい。

また、本発明の水晶体細胞は、上述の方法によって作製されたものである。

上記の水晶体細胞は、ES細胞から均質な細胞群として再生された

ものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。本発明の水晶体の利用方法として具体的には、該水晶体細胞を水晶体嚢内に注入し、水晶体厚の調節が可能なソフトな水晶体を再生するという方法が考えられる。この方法は、白内障の治療に有用であるとともに、白内障と老眼を同時に治療できるという利点も有している。

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、次の説明によって明白になるであろう。

図面の簡単な説明

図 1 (a) ~ 図 1 (d) は、本実施例において分化誘導されたレントイドを位相差顕微鏡によって観察した結果を示す図である。

図 2 は、本実施例において分化誘導されたレントイドを免疫染色した結果を示す図である。

図 3 (a) および図 3 (b) は、本実施例で分化誘導された細胞について、タンパク質の発現を調査したウエスタンブロット解析の結果を示す図である。図 3 (a) はクリスタリンアルファ A の発現を、図 3 (b) は Pax 6 の発現を、それぞれ調査したものである。

図 4 は、未分化 ES 細胞を維持する際の培地中の FGF-2 の濃度が、2、4、8 ng/ml の各場合における誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。

図 5 は、ES 細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示

すグラフである。

図 6 は、E S 細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始から 30 日経過後における F G F - 2 の濃度に応じたレントイドの誘導割合 (%) 示すグラフである。

5 図 7 (a) は、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す図である。図 7 (b) は、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す図である。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

15 本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 を 2 ~ 5 0 n g / m l の濃度で含有する培地を用いて E S 細胞を維持する E S 細胞維持工程と、上記 E S 細胞維持工程の後に、上記 E S 細胞をマウス頭蓋骨細胞 P A 6 上に 2 ~ 6 . 5 コロニー / c m ² の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 E S 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とするものである。

20 この水晶体細胞の作製方法は、E S 細胞を利用した分化誘導において、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髄細胞 P A 6 を用いる S D I A 法を利用したものであり、特にヒトなどを含む霊長類の E S 細胞に対して適用することができる。そして、本発明の水晶体細胞の作製方法は、特に以下の 3 つの点に特徴を有している。

(1) 未分化状態の E S 細胞の維持に使用する培地に添加する F G F -

2 の最終濃度

(2) E S 細胞を P A 6 に植え付けるときの細胞密度

(3) E S 細胞を P A 6 に植え付ける前に実施される E S 細胞の洗浄の回数

5 ここで、上記 3 つの特徴点について順に説明する。まず、(1) の未分化状態の E S 細胞の維持に使用する培地に添加する F G F - 2 の最終濃度について説明する。

10 本発明の水晶体細胞の作製方法においては、上記 E S 細胞維持工程において、線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 を $2 \sim 50 \text{ ng/ml}$ の濃度で含む培地を用いて E S 細胞を維持する。ここで E S 細胞を維持するとは、E S 細胞を未分化状態のまま維持することを意味し、この E S 細胞維持工程には、適宜 E S 細胞を継代することにも含まれる。また、上記培地には、細胞を培養・維持することが可能な種々の培地が含まれるものとする。

15 そして、上記 E S 細胞維持工程においては、培地中の線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 の最終濃度を 2 ng/ml 以上とすることで、後述の実施例にも示されるようにレントイドの分化を誘導することができる。また、上記 E S 細胞維持工程において、F G F - 2 の培地中の最終濃度が高くなり過ぎると、細胞増殖が強くなり維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、F G F - 2 の最終濃度は 50 ng/ml 以下とする。

20

また、後述の実施例には、F G F - 2 の濃度が 2 ng/ml の場合よりも 4 ng/ml の場合の方が、レントイドの分化誘導がより促進され、さらに、 4 ng/ml の場合よりも 8 ng/ml の場合の方が、レント

イドの分化誘導がより一層促進されること示されている。それゆえ、E S細胞維持工程における線維芽細胞増殖因子F G F - 2の維持培地中の濃度は、 $4 \sim 50 \text{ ng/ml}$ であることが好ましく、より良好な分化を誘導するためには、 $8 \sim 32 \text{ ng/ml}$ であることがさらに好ましい。

5 E S細胞の維持工程におけるF G F - 2の濃度条件以外の各条件については、従来公知の方法に従って行えばよい。この維持方法の具体的な例としては、実施例に記載の方法を挙げることができる。

続いて、本発明の第2の特徴点である(2)のE S細胞をP A 6に植え付けるときの細胞密度について説明する。

10 通常、S D I A法によるE S細胞の分化誘導においては、E S細胞の維持工程の後に、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髓細胞P A 6を用いてE S細胞を植え付け、分化の誘導を行う。本発明の水晶体細胞の作製方法においては、この分化誘導工程において、未分化状態が維持されたE S細胞の細胞密度を $2 \sim 6.5$ (コロニー/ cm^2)として、フィーダー細胞P A 6への植え付けを行う。なお、この細胞密度 $2 \sim 6.5$ (コロニー/ cm^2)とは、P A 6細胞を保有する内径 10 cm の培養皿1枚におけるコロニー数に換算すると、約 $150 \sim 500$ コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程におけるP A 6細胞へのE S細胞植え付け時の細胞密度を、 $150 \sim 500$ (コロニー/内径 10 cm の培養皿)とすると言い換えることもできる。

20 上記のように、P A 6への植え付け時のE S細胞密度を 2 (コロニー/ cm^2)以上とすることで、後述の実施例にも示されるように、特に霊長類などのE S細胞から、水晶体細胞を分化誘導することができる。

また、上記 E S 細胞密度が高くなり過ぎると、F G F - 2 の濃度の場合と同様に細胞の維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、上記 E S 細胞密度の上限は 6 . 5 (コロニー / c m ²) 以下とする。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法における、P A 6 細胞上への E S 細胞植え付け時の細胞密度は、2 . 5 ~ 4 . 0 (コロニー / c m ²) とすることがより好ましい。この細胞密度 2 . 5 ~ 4 . 0 (コロニー / c m ²) とは、P A 6 細胞を保有する内径 10 c m の培養皿 1 枚におけるコロニー数に換算すると、約 200 ~ 300 コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程における P A 6 細胞への E S 細胞植え付け時の細胞密度を、200 ~ 300 (コロニー / 内径 10 c m の培養皿) とすることが好ましい、と言い換えることもできる。なお、この細胞密度 200 ~ 300 (コロニー / 内径 10 c m の培養皿) という値は、神経誘導時における細胞密度の約 1 . 5 ~ 2 倍である。上記の細胞密度で植え付けを行うことによって、均質な水晶体細胞群をより安定して得ることができる。

なお、本発明の水晶体細胞の作製方法における分化誘導工程において、E S 細胞を P A 6 上に植え付けた後の培養条件については、従来公知の E S 細胞における分化誘導時の培養条件に従えばよい。具体的には、培養温度は 34 ~ 38 °C が好ましく、培養 p H は p H 6 . 0 ~ 8 . 0 が好ましい。また、培養系については、静置培養、回転培養、浸透培養等を適宜選択することができる。

続いて、本発明のもう一つの特徴点である (3) の E S 細胞を P A 6 に植え付ける前に実施される E S 細胞の洗浄の回数について説明する。

この E S 細胞の洗浄については、本発明の水晶体細胞の作製方法にお

1 1

いて、E S細胞維持工程と分化誘導工程との間に実施される。そして、本発明では、E S細胞維持工程において未分化状態が維持されたE S細胞を、E S分化培地を用いて1回のみ洗浄し、維持培地を洗い流すことが好ましい。

5 従来のSDIA法における未分化E S細胞の洗浄では、その回数は3回であったが、本発明では、この洗浄回数を3回から1回にすることによって、E S細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。

10 上記E S細胞の洗浄工程に用いられるE S分化培地としては、上記E S細胞から水晶体細胞への分化誘導時に用いる分化誘導培地と同じものを使用することが好ましい。そして、使用される上記E S分化培地の量は、未分化E S細胞ペレットの体積の30～100倍であることが好ましい。

15 上述の水晶体細胞の作製方法によって、E S細胞から水晶体細胞の分化誘導を行えば、PA6細胞上での2～3週間の培養によって、水晶体細胞およびその組織（レントイド）を安定して得ることができる。

20 なお、後述の実施例においても示されるように、E S細胞維持培地におけるFGF-2の濃度、および、植え付け時のE S細胞の細胞密度とともに増加させれば、分化の誘導は相乗的に高まる。それゆえ、上記FGF-2の濃度および上記E S細胞の細胞密度を、上述の範囲内でともに高くすれば、より良質な水晶体細胞を安定して作製することができる。

本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む霊長類のE S細胞において実施されることが好ましい。本発明を霊長類のE S細胞に適用すれば、ヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することがで

きるため、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。

また、本発明の水晶体細胞は、本発明の水晶体細胞の作製方法によって作製されたものであり、本発明の範囲内で条件を適宜変更させて作製された種々の水晶体細胞が含まれる。

5 本発明の水晶体細胞は、E S細胞の分化に関するメカニズムを解明や、白内障治療薬の研究開発に有用であるとともに、人工の眼内レンズよりもレンズ厚の調節能に優れた眼内レンズとして使用できる可能性を有している。

〔実施例〕

10 以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。本実施例では、霊長類のE S細胞の一例として、カニクイザル (Cynomolgus Monkey) のE S細胞を用いて水晶体細胞の分化誘導が実施された。

〔1〕実験方法

15 本実施例は、以下の(1)から(4)に記載の方法で行われた。

(1) E S細胞の維持

先ず、本実験に用いられるカニクイザルのE S細胞の入手方法について説明する。

20 E S細胞系は、従来文献 [Suemori H., Tada T., Torii R. et. al., Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI, Dev Dyn., 2002 年、222 巻、273-279 頁] の記載に基づいて、カニクイザルの胚盤胞から得られた。そして、その多能性が確認された。

未分化のE S細胞は、マイトマイシンCによって不活性化されたマウ

13

ス胚性幹線維芽（S T O細胞）のフィーダー層上に保持された。細胞は
0.1 mM 2-メルカプトエタノール（シグマ製）、1000 U/ml
1 白血病抑制因子（E S G R O、ケミコン製）、20% ノックアウト
血清代替物（ギブコ製）、0.1 mM 非必須アミノ酸（ギブコ製）、
5 8 ng/ml 線維芽細胞増殖因子（F G F-2、アップステート製）
が補われたD M E M / F-12培地（シグマ製）で培養された。培地は
毎日交換された。

その後、E S細胞の継代は、0.25%トリプシンを含む1 mM C
a C l₂ P B S溶液、20% ノックアウト血清代替物で処理された。
10 そして、マウス頭蓋骨髓由来のP A 6上に植え付ける3～4日前から、
線維芽細胞増殖因子F G F-2が濃度2、4、8 ng/mlでそれぞれ
添加された。

（2）レントイドの誘導

続いて、F G F-2を各濃度で含有する培地上で維持されたE S細胞
15 について、以下のような手順で分化の誘導が実施された。

P A 6はフィーダー細胞層として使用するために、ゼラチンコートさ
れた培養皿に植え付けられた。トリプシン処理に続いて、部分的に分離
されたE S細胞群（30～50個/1群）は、ゼラチンでコートされた
10 10% F B S（ハイクローン製）を含むG M E M培地（ギブコ製）上
に播かれた。37℃で30分間のインキュベートの後、E S細胞はピペ
20 ッティングによって分散された。遠心分離によって集められた細胞ペレ
ットは、E S分化培地〔10% ノックアウト血清代替物、1 mM ピ
ルビン酸（シグマ製）、0.1 mM 非必須アミノ酸、0.1 mM 2
-メルカプトエタノール（和光製）〕とともに洗浄された。

その後、洗浄されたES細胞は、PA6フィーダー細胞層上に植え付けられ、分化の誘導が試みられた。なお、この植え付け工程では、PA6細胞上に植え付けられるES細胞の細胞密度が、高密度（200コロニー以上／内径10cmの培養皿）のものと、低密度（150コロニー以下／内径10cm培養皿）のものの2種類が作製された。植え付けられたES細胞は、分化培地で少なくとも6週間培養された。培地は3日間ごとに交換された。

（3）培養細胞の免疫組織化学的調査

上記（2）の方法で培養された細胞について、免疫組織化学的な調査が実施された。

細胞は4% パラホルムアルデヒド（和光製）中で1時間保持され、その後25% スクロースPBS中に浸された。0.1M リン酸バッファー（PB）で洗浄された後、試料は0.005% サポニン（0.1M PB-saponin、メルク製）を含む0.1M PB中で20% 脱脂粉乳とともに1時間インキュベートされ、非特異的な抗体結合をブロックした。5% 脱脂粉乳を含む0.1M PB-saponin で希釈された一次抗体とともに、試料は4℃で24時間インキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗クリスタリンアルファA（1：1000、ストレスジェン製）が一次抗体として使用された。この抗体の活性は、ポジティブコントロールとしてラットのレンズを使用して確認された。0.1M PBでの洗浄後に、試料は、5% 脱脂粉乳を含む0.1M PB-saponin で希釈されたフルオレセイン共役ロバ抗ウサギ免疫グロブリン（1：100、アマシャム製）二次抗体とともに室温で1時間インキュベートされた。0.1M PBで洗浄した後、試料はグリセロール

ーPBS (1 : 1) とともにスライドに固定され、レーザー自動読み取り共焦点顕微鏡 (ライカ製) で観察された。

(4) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット解析

5 上記 (2) の方法で培養された細胞について、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット解析が実施された。

細胞はスクラッピングによって集められ、5 mM 2-メルカプトエタノール (和光製) を含む 500 μ l の溶解バッファー (レムリサンプルバッファー、バイオラッド製) 中に溶解された。細胞懸濁液は氷上で均質化された。均質化された細胞は-80℃で保存された。ES細胞溶解物は電気泳動にかけられ、分離されたタンパク質は、PVDF膜 (Immobilom-P、ミリポア製) に転写された。非特異的抗体結合は、20%脱脂粉乳を含む0.1M PBとの1時間のインキュベーションによってブロックされた。ブロットは5%脱脂粉乳を含む0.1M PBで希釈された一次抗体とともに室温でインキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗体、抗クリスタリンアルファA (1 : 1000、ストレスジェン製) および、抗Pax6 (1 : 200、サンタクルーズ製) が、一次抗体として使用された。一次抗体結合は、ABC法に基づいてアルカリフォスファターゼ (1 : 100、ヴェクター製) と結合した抗ウサギIgGを使用して検出された。0.1M PBで洗浄された後、ブロットはプロトコルに従ってフォスファターゼ基質 (コニカ免疫染色、コニカ製) とともに現像された。

10
15
20

[2] 結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下の (1) から

(4) に示す。

(1) レントイドの誘導について

PA6細胞上での2～3週間の培養によって、ES細胞コロニー全体が色素沈着を引き起こすことなく成長し続ける分化細胞が作製された。

5 これらの細胞を位相差顕微鏡によって観察した結果を図1(a)から図1(d)に示す。図1(a)は、誘導開始から30日後の比較的小さな細胞であり、図1(b)は、誘導開始から53日後の大きな細胞を観察した結果である。図1(a)および図1(b)に示すように、培養された細胞は、最終的に蓄積して大きさを変化させる透明体を形成した。なお、各図の右下に示すバーによって、その大きさがわかる。

図2には、分化誘導された細胞について、免疫染色を行った結果を示す。図2において白く示される部分が、免疫染色によって染色された部分である。この結果から、分化誘導された細胞が抗クリスタリンアルファA抗体を有していることが確認され、分化誘導された細胞がクリスタリンアルファAを発現していることが分かった。これによって、分化誘導された細胞はレントイドとして特徴付けられた。

また、いくつかのコロニーが、網膜色素性上皮細胞を形成することが確認された(図1(c)参照)。網膜色素性上皮細胞のほとんどが、レントイドを含むコロニーから独立したコロニーにおいて発生した。実際の眼で確認されるのと同じ形状で、レントイドと網膜色素性上皮細胞とが一つのコロニー内に存在するものも見られた(図1(d)参照)。

なお、このレントイドは、誘導開始から14～16日後に初めて確認された。レントイドを含むコロニーの比率は、誘導開始から20日後から次第に増加した。レントイドの数は、誘導開始から40日以内でピー

クに達した。

(2) ウェスタンブロッティングによる解析結果

レントイドによるクリスタリンアルファAの発現が、ウェスタンブロット解析によってさらに調査された。具体的には、分化誘導から40日後のレントイドのタンパク質がPVDF膜に転写された後、電気泳動が行われ、抗クリスタリンアルファA抗体あるいは抗Pax6抗体の探査が行われた。

その結果を図3(a)および図3(b)に示す。図3(a)は、クリスタリンアルファAの発現を調査したウェスタンブロット解析結果であり、レーン1はポジティブコントロール(ラットの水晶体タンパク質)、レーン2はネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)、レーン3はSDIA法によるレントイドタンパク質の全量である。図3(b)は、Pax6の発現を調査したウェスタンブロット解析結果であり、レーン1はPA6細胞のタンパク質、レーン2は未分化のES細胞の全量タンパク質、レーン3はSDIA法によるレントイド細胞の全量タンパク質である。

図3(a)に示すように、ウサギ抗クリスタリンアルファAポリクローナル抗体は、22kDaのタンパク質を検知した。クリスタリンアルファタンパク質を示すシングルバンドは、レーン3のSDIA法によって分化誘導されたES細胞溶解液中では検出されたが、レーン2のネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)においては検出されなかった。レーン1のポジティブコントロール(ラット水晶体タンパク質)においては、2つのバンド(22kDaと25kDa)が検出された。25kDaのバンドは、ラットの α -クリスタリンで発現し得るA^{ins}と

思われる。

図3 (b) に示す Pax 6 の発現に関して言えば、ウサギ抗 Pax 6 抗体は、48 kDa の Pax タンパク質を検出した。Pax 6 は合成したレントイド内 (レーン3) においては発現するが、PA6 フィーダー細胞 (レーン1) や未分化の ES 細胞 (レーン2) においては発現しないことが確認された。

従来文献 [Furuta Y., Hogan BL., BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo, Genes Dev, 1998 年、12 巻、3764-3775 頁] に報告されているように、Pax 6 は水晶体の形成に必須である。眼胞と表皮外胚葉との相互作用における Pax 6 の発現は、水晶板の形成と、嵌入を誘導する。水晶体の前駆体に Pax 6 が欠如すると、水晶体の形成において欠陥が生じる。

本実験において、ES 細胞の分化からレントイドにおける Pax 6 の発現が導かれるということが確認された。Pax 6 は、ES 細胞からのレントイドの形成と、通常の発達の両方の機能を担う重要な因子であることが示唆される。また、この結果から、SDIA 法による ES 細胞の分化誘導によって、水晶体が形成されたことが裏付けられた。

(3) レントイド誘導における外因性 FGF-2 の影響について

続いて、霊長類の ES 細胞からのレントイドを誘導する場合における FGF-2 濃度の影響を評価した。その結果を図4に示す。図4は、未分化 ES 細胞を維持する際の培地中の FGF-2 の濃度が、2、4、8 ng/ml の各場合における誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。なお、図4では、FGF-2 の濃度が 2 ng/ml の場合を◆で示し、4 ng/ml の場合を■で

示し、8 ng/ml の場合を△で示している。

図4に示すように、誘導開始から20日間は、濃度の違いによる有意な差は見られなかった。誘導開始から30日以上経過後には、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、FGF-2濃度の増加に伴って
5 用量依存的に増加した。本願発明者等はまた、FGF-2をES分化培地へ添加することを試みた。しかし、PA6細胞の成長があまりにも早すぎるため、分化するES細胞を維持することはできなかった（データ示さず）。

FGFが水晶体の分化と発達において重要な役割を果たし得るということは、いくつかの研究で報告されている。例えば、哺乳類においては、
10 線維芽細胞成長因子（FGF）は、水晶体線維の分化を促進することが確認されている（参考文献〔Chamberlain CG., McAvoy JW., Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation, Curr Eye Res, 1987年、6巻、1165-1169頁〕）。

15 FGF-1およびFGF-2は、発達段階においてマウスの神経網膜と水晶体細胞で発現し、FGFR（FGFレセプター）-1、および-2も水晶体細胞で発現する。

本実験では、未分化ES細胞維持培地におけるFGF-2濃度の増加が、レントイドの分化に影響を及ぼすことが示された。つまり、FGF-2の濃度を維持培地中に2 ng/mlよりも多く含有させることで、その後のレントイドの分化誘導を促進させることができるということが確認された。この結果から、FGF-2は、SDIA培地での分化因子のレセプターを上方制御することによって、未分化ES細胞を分化因子に
20 上手く応答させる可能性が示唆される。

(4) レントイド誘導におけるコロニー密度の影響について

次に、P A 6 フィーダー細胞に E S 細胞を植え付ける場合の E S 細胞の細胞密度とレントイド誘導との関係を調べた結果を図 5 に示す。図 5 は、E S 細胞密度が高密度 (200 コロニー以上 / 10 c m の培養皿 : 図 5 では ■ で示す) の場合、低密度 (150 コロニー以下 / 内径 10 c m 培養皿 : 図 5 では ◆ で示す) の場合、それぞれの誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。

図 5 に示すように、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、培養段階の開始時に添加された E S コロニーの密度に比例して増加した。

また、図 6 には、誘導開始から 30 日経過後における F G F - 2 の濃度に応じたコロニー密度の影響を示す。図 6 のグラフでは、左から順に F G F - 2 の濃度が 2 n g / m l の場合、4 n g / m l の場合、8 n g / m l の場合のレントイドの誘導割合 (%) を示し、また、各濃度の F G F - 2 について、白色の棒グラフがコロニー密度の低いもの (150 コロニー以下 / 内径 10 c m 培養皿)、黒色の棒グラフがコロニー密度の高いもの (200 コロニー以上 / 10 c m の培養皿) を示している。

図 6 に示すように、誘導から 30 日後において、P A 6 細胞上に高密度 (200 コロニー以上 / 10 c m の培養皿) で植え付けられた培養液中の E S 細胞分化によって誘導されたレントイドの数は、低密度 (150 コロニー以下 / 10 c m 培養皿) で植え付けられた場合のレントイドの数と比較して多かった。また、レントイド細胞の数は、誘導に先立って植え付けられた E S 細胞の密度の増加に伴って直線的に増加することがわかった。同様の結果が誘導開始から 40 日後に観察された。しかしながら、20 日では有意な差は観察されなかった。

21

なお、図7 (a) には、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、種々のレントイドがいくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは100 μ mである。図7 (b) には、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、矢印で示す網膜の色素性上皮細胞は、いくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは100 μ mである。このように、網膜の色素性上皮細胞の誘導についても、コロニー密度が高い培養液で増加した。

以上の結果から、植え付けられたコロニーの密度は、レントイド誘導の量に影響を及ぼす可能性を示唆する。細胞間接触は、マウスの水晶体上皮細胞によるレントイドの形成に重要である。また、鶏のヒナの神経網膜の水晶体への分化転換も、幾層にも関連して混み合った状況下で起きる。このように、レントイドの形成は、混み合った状態で発生する傾向にあり、それゆえ、コロニー密度は重要な分化因子となり得る。コロニー密度は、網膜の色素性上皮細胞の分化量に影響を及ぼし得る。これらのデータは、コロニーが混み合った状態の場合に、その後に行われるSDIA処理によって、眼球細胞がより形成されやすくなるということを示唆する。

本実験結果をまとめると、ES細胞の維持過程において維持培地のFGF-2濃度を高くし、PA6上に植え付けられるES細胞のコロニー密度を高くして、SDIA法を実施することによって、カニクイザルのES細胞から安定してレントイドを再生することができることが確認された。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

以上のように、本発明の水晶体細胞の作製方法によれば、ES細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。上記の方法で作製された水晶体細胞は、ES細胞から均質な細胞群として再生されたものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。

本発明は、ヒトを含む霊長類のES細胞から水晶体への分化誘導を成功させた初めての例であり、ES細胞の分化に関するメカニズムを解明に寄与するという学術的意義を有するだけでなく、白内障治療薬の研究開発に役立てることができるという医薬分野の発展に寄与する可能性も有している。それゆえ、本発明の有用性は高い。

23

請求の範囲

1. 線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を $2 \sim 50$ (ng/ml) の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、

5 上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨細胞 PA6 上に $2 \sim 6.5$ (コロニー/cm²) の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とする水晶体細胞の作製方法。

10 2. 上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記 ES 細胞を、ES 分化培地を用いて 1 回洗浄する洗浄工程をさらに含むことを特徴とする請求の範囲 1 に記載の水晶体細胞の作製方法。

15 3. 上記 ES 分化培地は、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化誘導時に用いる分化誘導培地と同じものを用いることを特徴とする請求の範囲 2 に記載の水晶体細胞の作製方法。

20 4. 上記 ES 細胞維持工程において、上記培地には線維芽細胞増殖因子 FGF-2 が $4 \sim 50$ ng/ml の濃度で含まれていることを特徴とする請求の範囲 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞の作製方法。

5. 上記分化誘導工程において、上記 PA6 細胞へ上記 ES 細胞を植え付ける時の細胞密度を、 $2.5 \sim 4.0$ (コロニー/cm²) とすることを特徴とする請求の範囲 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞

の作製方法。

6. 上記ES細胞は、霊長類由来のものであることを特徴とする請求の範囲1ないし5の何れか1項に記載の水晶体細胞の作製方法。

5

7. 上記ES細胞は、カニクイザル由来のものであることを特徴とする請求の範囲6に記載の水晶体細胞の作製方法。

8. 請求の範囲1ないし7の何れか1項に記載の水晶体細胞の作製方法
10 によって得られる水晶体細胞。

図 1 (a)

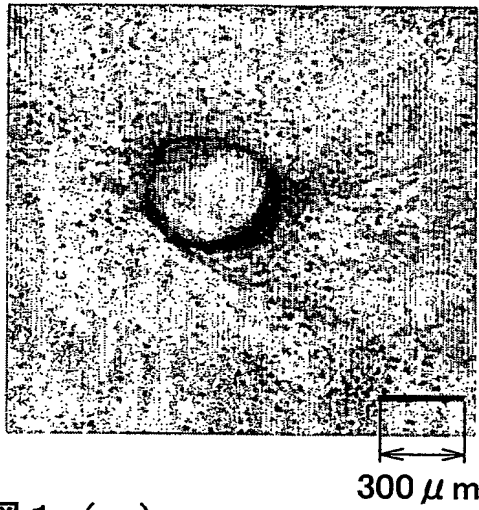


図 1 (b)

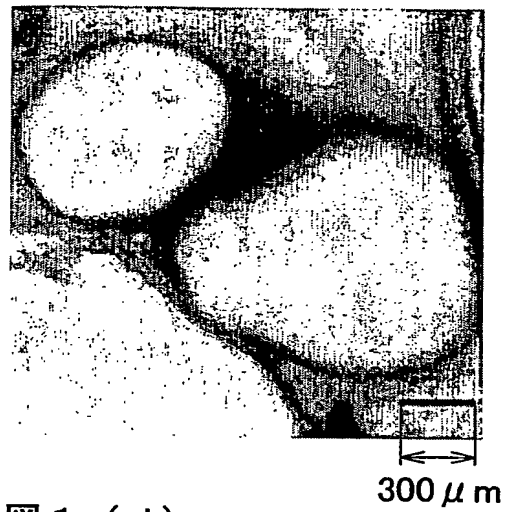


図 1 (c)

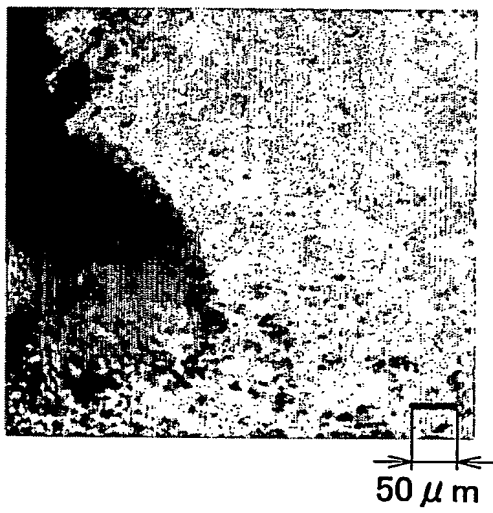
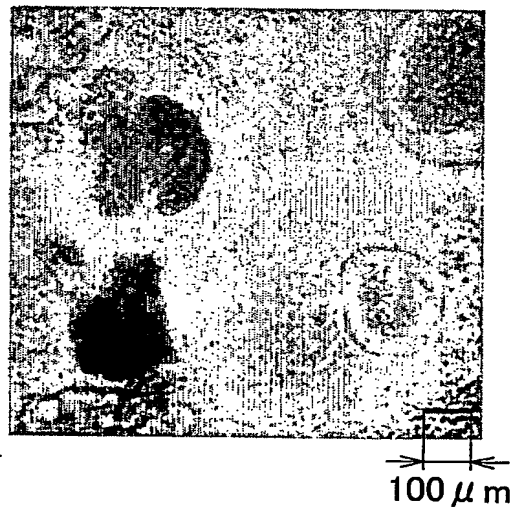
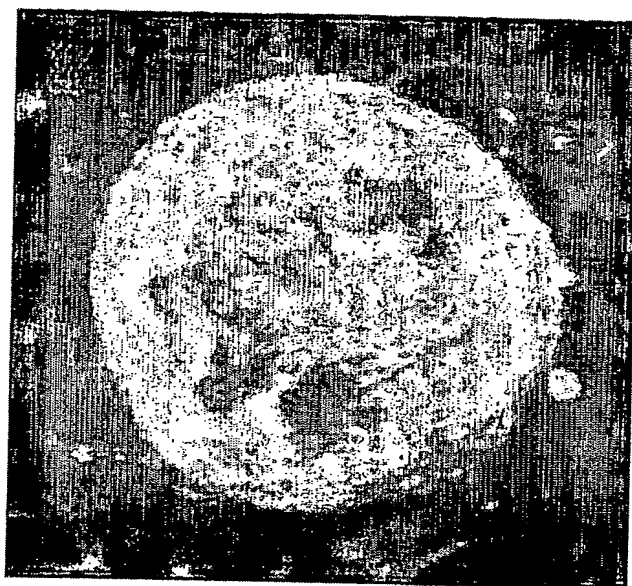


図 1 (d)



2/7

図 2



3/7

図 3 (a)

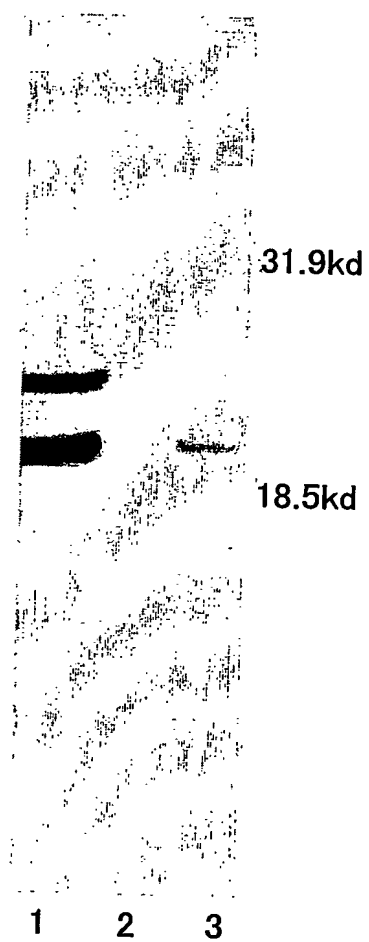
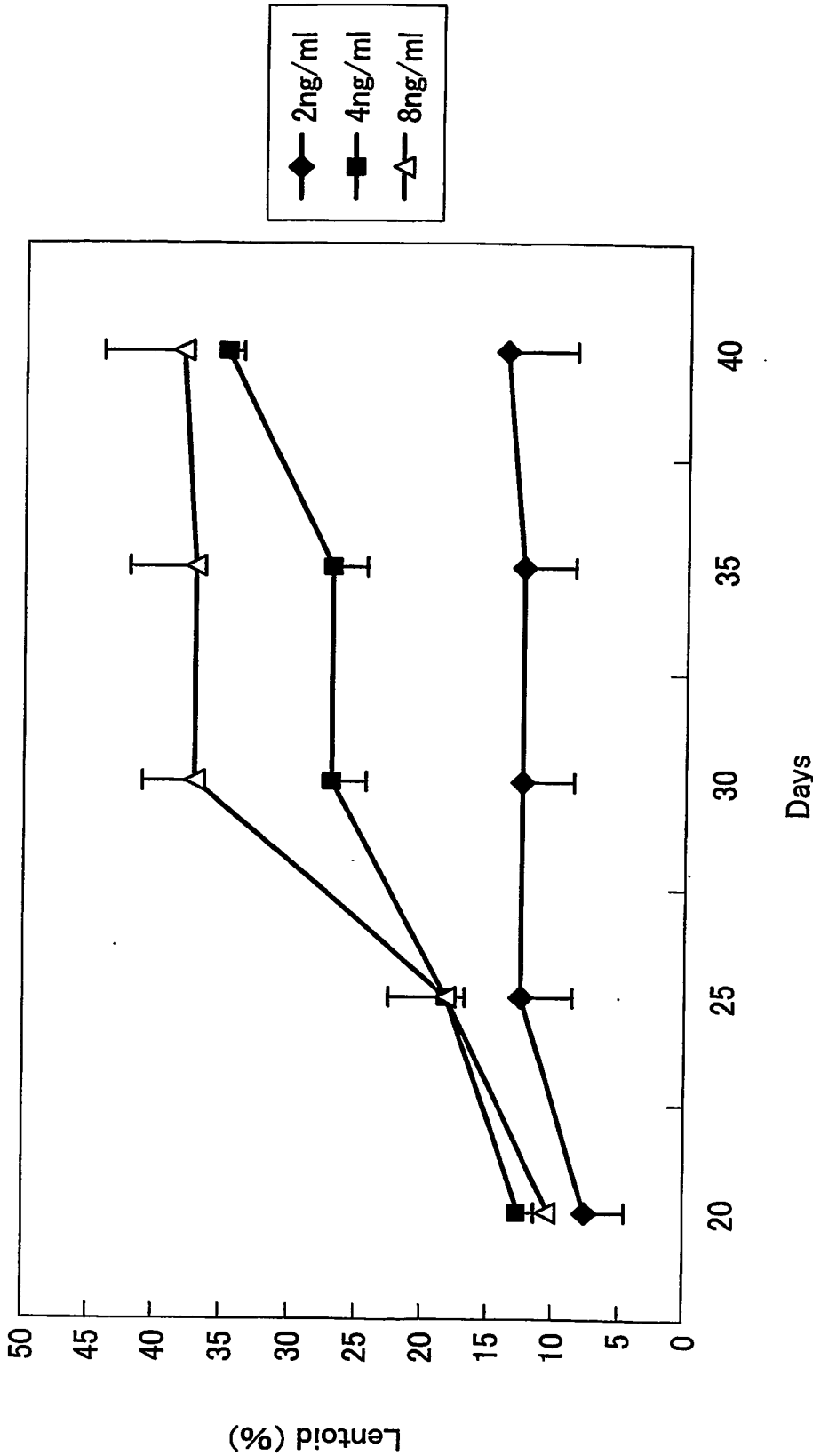


図 3 (b)

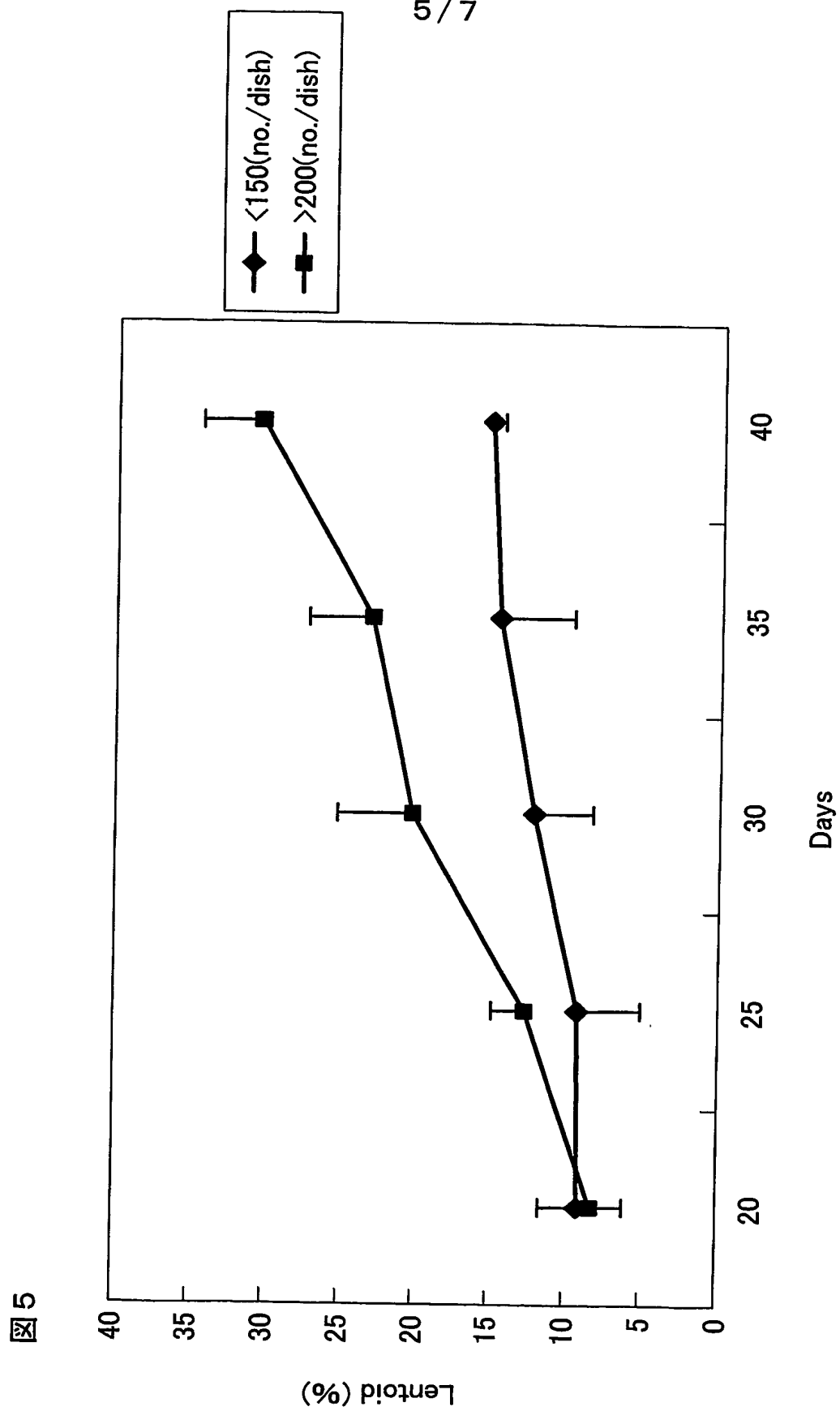


4 / 7

図 4



5/7



6/7

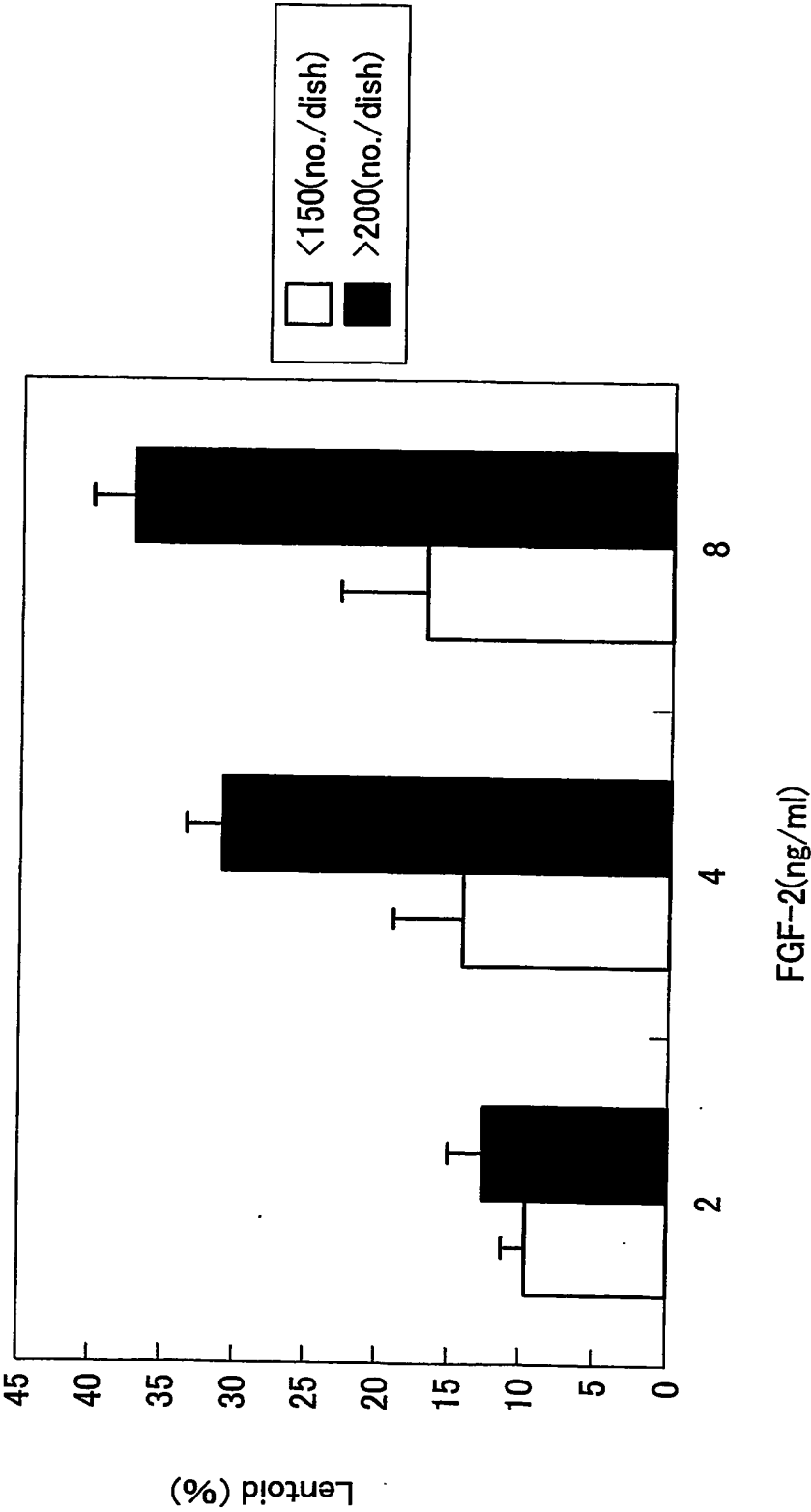


Fig 6

7/7

図 7 (a)

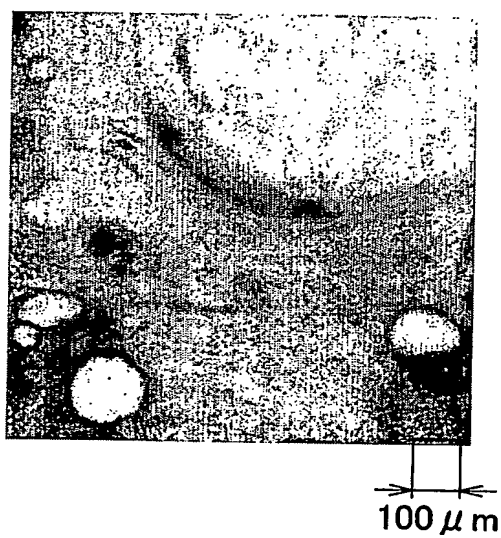
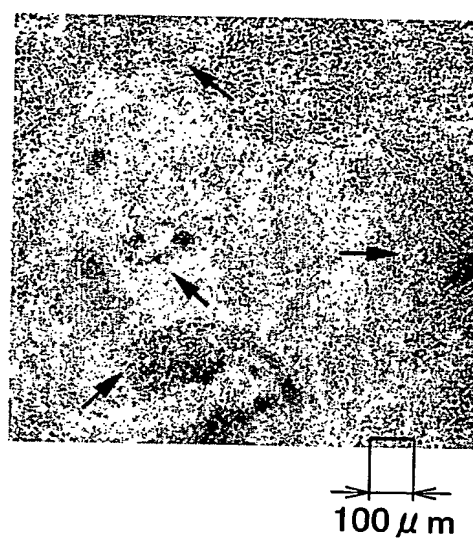


図 7 (b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/00, A61F2/14, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/00, A61F2/14, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	OOTO, S. et al., Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells., Invest Ophthalmol Vis Sci., 2003 June, Vol.44(6), pages 2689 to 2693	1-8
P, A	Masayo TAKAHASHI, "Momaku no Saisei Iryo.", Saisei Iryo, 2003 August, Vol.2(3), pages 15 to 20	1-8
P, A	HIRANO, M. et al., Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells., Dev Dyn., 2003 December, Vol.228(4), pages 664 to 671	1-8
A	WO 02/38741 A (Bresagen Ltd.), 16 May, 2002 (16.05.02), & AU 1368402 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April, 2004 (20.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003848

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWASAKI, H. et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 05 February, 2002 (05.02.02), Vol.99(3), pages 1580 to 1585	1-8
A	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Neuron, 2000 October, Vol.28(1), pages 31 to 40	1-8
A	KAWAMORITA, M. et al., In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells after activation by retinoic acid., Hum.Cell., 2002 September, Vol.15(3), pages 178 to 182	1-8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003848

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	OOTO, S et al., Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Jun, vol. 44(6), pp. 2689-2693	1-8
PA	高橋政代, 網膜の再生医療. 再生医療. 2003 Aug, vol. 2(3), pp. 15-20	1-8
PA	HIRANO, M et al., Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. Dev Dyn. 2003 Dec, vol. 228(4), pp. 664-671	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/38741 A(Bresagen Limited) 2002.05.16 & AU 1368402 A	1-8
A	KAWASAKI,H et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 5, vol. 99(3), pp.1580-1585	1-8
A	KAWASAKI,H et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron. 2000 Oct, vol.28(1), pp.31-40	1-8
A	KAWAMORITA,M et al., In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells after activation by retinoic acid. Hum Cell. 2002 Sep, vol.15(3), pp.178-182	1-8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.